

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 828**

51 Int. Cl.:
C12N 15/75 (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07722767 .6**
96 Fecha de presentación: **24.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1989309**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **MODIFICACIÓN GENÉTICA DE BACILOS TERMOFÍLICOS HOMOLÁCTICOS.**

30 Prioridad:
24.01.2006 EP 06100778
23.03.2006 EP 06111636

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.01.2012

73 Titular/es:
PURAC BIOCHEM BV
ARKELSEDIJK 46
4206 AC GORINCHEM, NL

72 Inventor/es:
VAN KRANENBURG, Richard;
VAN HARTSKAMP, Mariska;
HEINTZ, Eelco, Anthonius, Johannes;
VAN MULLEKOM, Ms. Esther, Johanna,
Geertruda y
SNELDERS, Mr. Jurgen

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 371 828 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modificación genética de bacilos termofílicos homolácticos.

- 5 La presente invención se refiere a la modificación genética para aplicaciones industriales de especies de *Bacillus* moderadamente termofílicos que son facultativamente anaeróbicos y homolácticos.

El ácido láctico y sus sales, conocidas como lactatos, son productos comercialmente viables, utilizables en diferentes campos, incluyendo la medicina, polímeros biodegradables, y proceso de alimentos. Las especies de *Bacillus* moderadamente termofílicos que son facultativamente anaeróbicos y homolácticos son organismos ideales para la fabricación industrial de ácido láctico. Son capaces de crecimiento a temperaturas entre 30-65°C y permiten la fermentación industrial anaeróbica a temperaturas por encima de 50°C. Esta elevada temperatura tiene varias ventajas cuando se efectúa la fermentación a escala industrial: menos riesgo de infecciones y, por lo tanto, mayor pureza enantiomérica, reacciones más rápidas, etc. La naturaleza homoláctica permite la producción de ácido láctico a partir de fuentes de hidrocarburos (incluyendo azúcares en peso hexosa y pentosa; ver el documento WO 04/063382) sin la formación de más de 15% de productos secundarios, tales como ácido fórmico y ácido acético. La naturaleza anaeróbica facultativa de los *Bacillus* permite la fermentación en condiciones anaeróbicas o, como mínimo, bajo una presión parcial baja de oxígeno, lo cual es deseable a escala industrial porque permite equipos y procesos relativamente económicos. Además, las exigencias de nutrientes de estas bacterias son menos exigentes que las bacterias de ácido láctico, tales como las de las especies *LactoBacillus*, lo que permite también un proceso industrial relativamente económico. Una desventaja de los *Bacillus* moderadamente termofílicos conocidos que son facultativamente anaeróbicos y homolácticos, es el hecho de que no producen R-lactato o virtualmente no lo hacen. Dado que la aplicación satisfactoria de polímeros biodegradables de ácido láctico dependerá en la disponibilidad de ácido S-láctico y ácido R-láctico poco costosos, se requiere una producción efectiva en cuando a costes de ambos enantiómeros. Las bacterias actualmente conocidas para la producción de R-lactatos son, o bien mesofílicas (por ejemplo, *Bacillus laevolacticus*) o tienen exigentes requerimientos de nutrientes (por ejemplo, *LactoBacillus delbrueckii*), lo que hace la fabricación de R-lactato mucho más cara que la del S-lactato.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención consiste en conseguir una cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica que es facultativamente anaeróbica y que produce ácido R-láctico por fermentación homoláctica. Otro objetivo de la invención es conseguir un método para producir bacilos moderadamente termofílicos mediante ingeniería genética, que son facultativamente anaeróbicos y homolácticos.

El género *Bacillus* comprende más de 200 especies distintas (Ver Sneath, P.H.A., 1986: Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. en el manual de Bergey's de bacteriología sistemática Vol 2. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (eds) Williams & Wilkins, Baltimore). Solamente, una pequeña fracción de éstas son conocidas como accesibles genéticamente. Por ejemplo, la transformación de protoplastos funciona para una serie de especies distintas de *Bacillus*, pero la transformación de células competentes ha sido demostrada solamente que funciona satisfactoriamente para células de *Bacillus subtilis* 168, estrictamente aeróbicas y mesofílicas. Las cepas industriales son frecuentemente más resistentes a la modificación genética, tal como es sabido por *Bacillus licheniformis*. Esta especie de *Bacillus* moderadamente termofílicos, facultativamente anaeróbicos, se utiliza para la producción industrial de enzimas. No obstante, dado su naturaleza heteroláctica, no se puede utilizar para la producción de ácido láctico (Ver Bulthuis, B. A., C. Rommens, G.M. Koningstein, A. H. Stouthamer, H. W. van Verseveld, 1991: Formation of fermentation products and extracellular protease during anaerobic growth of *Bacillus licheniformis* in chemostat and batch-culture, Antonie van Leeuwenhoek 60:355-371). En general, los procesos de transformación de alta frecuencia no son disponibles para cepas industriales (Ver Outtrup, H., y S. T. Jørgensen, 2002: The importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes in Applications and systematics of *Bacillus* and relatives. R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, y P. of Vos (eds.), pp. 206-218, Blackwell Publishing, Malden, USA). Estas cepas pueden ser modificadas por transformación de protoplastos, tal como se da a conocer en el documento US 6.083.718.

Hasta el momento, no se han descrito métodos que demuestren ingeniería genética de especies de *Bacillus* moderadamente termofílicos que son facultativamente anaeróbicos y homolácticos. Si bien se ha publicado un informe que reivindica la transferencia de plásmido de *B. subtilis* a *Bacillus coagulans* por fusión de protoplastos (Ver Ball, A.S., y C. Edwards, 1989: Properties of protoplasts from the thermophile *Bacillus coagulans* and their significance for genetic studies. Lett. Appl. Microbiol. 9:141-144), no proporciona pruebas de que *B. coagulans* albergue ciertamente el plásmido. Dicha reivindicación se basa solamente en la observación del crecimiento de colonias resistentes a antibióticos, que podrían consistir igualmente en mutantes espontáneos resistentes a los antibióticos. Los inventores han observado dichos mutantes espontáneos resistentes a los antibióticos de *B. coagulans* frecuentemente para varios tipos de antibióticos. En otra publicación: Transformation of *Bacillus* spp.: An Examination of the transformation of *Bacillus* protoplasts by plasmids pUB110 and pHV33, Current Microbiology, Vol 13 (1986), pp 191-195, se ha descrito la transformación de protoplastos en diferentes bacilos. No obstante, la transformación en *B. coagulans* se indicó como no satisfactoria.

- La electroporación es utilizada ampliamente para bacterias, pero requiere la optimización específica para la especie (o incluso específica para la cepa) del medio de crecimiento y del tampón de electroporación. La electroporación satisfactoria de especies de *Bacillus* requiere frecuentemente metilación *in vivo* o *in vitro* de ADN plásmido para impedir su restricción después de la transformación. El documento WO 02/29030 da a conocer la introducción *in vivo* de plásmido metilado en células de la cepa TN de *Bacillus* termofílico por electroporación. El plásmido utilizado se basa en el plásmido termosensible pUB110. No obstante, los inventores han descubierto que este plásmido no proporcionó células transformadas cuando se utilizó para transformar especies de *Bacillus* moderadamente termofílicas que son facultativamente anaeróbicas y homolácticas.
- Los inventores han descubierto que es posible la modificación genética de especies de *Bacillus* moderadamente termofílicas que son facultativamente anaeróbicas y homolácticas por ingeniería genética. De este modo, la presente invención demuestra por primera vez que la ingeniería genética de especie *Bacillus* homoláctica facultativamente anaeróbica, moderadamente termofílica por transformación. Además de la ingeniería genética de dichos *Bacillus* moderadamente termofílicos que son facultativamente anaeróbicos y homolácticos para la producción de ácido R-láctico, los bacilos pueden ser sometidos también a ingeniería genética para la producción de compuestos industriales, incluyendo otros ácidos orgánicos a parte del ácido láctico, alcohol, enzimas, aminoácidos y vitaminas.
- De acuerdo con la invención, es importante que la especie *Bacillus* moderadamente termofílica sea homoláctica, porque esto asegura que la nueva funcionalidad introducida tendrá como resultado una producción con alto rendimiento con una pequeña cantidad de subproductos. Además, la utilización de la especie *Bacillus* homoláctica posibilita que solamente se tienen que aplicar unas pocas modificaciones a efectos de obtener un microorganismo industrialmente aplicable.
- La especie *Bacillus* moderadamente termofílica, se definen como bacterias capaces de crecer a temperaturas comprendidas entre 30-65°C. Son ejemplos de especies moderadamente termofílicas facultativamente anaeróbicas homolácticas, *Bacillus coagulans* y *Bacillus smithii*. Los bacilos homolácticos pueden producir de manera natural S-lactato por fermentación homoláctica. Cuáles son las cepas específicas que pueden producir ácido láctico por fermentación homoláctica se puede determinar fácilmente por los técnicos en la materia. La presente invención comprende también cepas derivadas de especie *Bacillus*, facultativamente anaeróbica, moderadamente termofílica, en la que el fenotipo homoláctico está modificado. Preferentemente, se escoge una cepa o derivado que tiene deficiente esporulación.
- Dado que no se tenía literatura disponible sobre la transformación de Bacilos homolácticos facultativamente anaeróbicos moderadamente termofílicos, los inventores necesitaron encontrar un plásmido capaz de replicarse en estos Bacilos, necesario para utilizar el método de introducción de ADN en las células y necesario para encontrar un marcador seleccionable adecuado para el grupo definido de especie *Bacillus*, a efectos de obtener por ingeniería genética estos bacilos, por transformación.
- Los inventores decidieron utilizar electroporación como método para encontrar qué plásmidos podrían replicar en estos Bacilos. Los plásmidos sometidos a prueba fueron pL253 (Ver Simon, D., y A. Chopin, 1988: Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*, *Biochimie* 70:559-566), pMV158 (Ver Burdett, V., 1980: Identification of tetracycline resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B), *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 753-766.), pHP13 (Ver Haima, P., S. Bron, G. Venema, 1987: The effect of restriction on shotgun cloning and plasmid stability in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* 209:335-342.), pUB110 (Ver Keggins, K.M., P. S. Lovett, E. J. Duvall, 1978: Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1423-1427), pAMS100 (ver Kiewiet, R., J. Kok, J.F.M.L. Seegers, G. Venema, S. Bron, 1993: The mode of replication is a major factor in segregational plasmid instability in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:358-364), pWCFS105 (Ver Van Kranenburg, R., N. Golic, R. Bongers, R.J. Leer, W.M. de Vos, R.J. Siezen, M. Kleerebezem, 2005: Functional anyalysis of three plasmids from Lacto*Bacillus* plantarum, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1223-1230), pNZ280 (Ver Platteeuw, C., F. Michiels, H. Joos, J. Seurinck, y W.M. de Vos, 1995: Characterization and heterologous expression of the tetL gene and identification of iso-ISS1 elements from *Enterococcus faecalis* plasmid pJH1, *Gene* 160: 89-93.), pNZ124 (Ver Platteeuw, C., G. Simons, y W. M. de Vos. 1994: Use of the *Escherichia coli* β -glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 60:587-593), y pNW33n (Ver Zeigler, D.R. 2001: The genus *GeoBacillus*: introduction and strain catalog, 7th e d., vol. 3. *Bacillus* Genetic Stock Center. www.bgsc.org). Después de varias pruebas, se descubrió que los últimos tres plásmidos podrían replicar y proporcionaron transformantes.
- Una vez se identificó un plásmido que podía replicar en estos Bacilos, se pudieron optimizar convenientemente otros parámetros de procesos relativos al protocolo de transformación. Además, se pudieron comprobar, en cuanto a su factibilidad, otros métodos para la introducción de ADN, tales como transformación natural o conjugación.
- Las pruebas con marcadores de resistencia a antibióticos demostraron que se podían utilizar, como mínimo, resistencia a cloramfenicol, resistencia a tetraciclina y resistencia a kanamicina. Se debe tener cuidado en evitar

concentraciones demasiado bajas, dado que éstas pueden dar lugar a colonias espontáneas resistentes a los antibióticos. La introducción del gen de resistencia a eritromicina a partir de pIL253 clonado en pNZ124 o pNW33n no proporcionó transformantes.

5 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención da a conocer un método, tal como se define en la reivindicación 1, o una modificación genética de especie *Bacillus* moderadamente termofílica que son facultativamente anaeróbicos y homolácticos por medio de ingeniería genética. El método comprende las siguientes etapas:

10 introducción de ADN clonado en un sistema plásmido termosensible, conteniendo un replicón pSH71 o un homólogo del mismo en células de una especie *Bacillus* moderadamente termofílica que es facultativamente anaeróbica y homoláctica;

15 cultivo de células en un medio selectivo a una temperatura permisible para replicación de plásmidos para seleccionar células transformadas capaces de crecimiento en dicho medio selectivo a dicha temperatura permisible;

20 cultivar dichas células transformadas en un medio selectivo a una temperatura no permisible para replicación de plásmidos para células transformadas seleccionadas capaces de crecimiento en dicho medio selectivo a dicha temperatura no permisiva.

25 El cultivo de células a la temperatura permisiva en un medio selectivo permite la selección de transformantes, es decir, células que han tomado el ADN transformante. Preferentemente, las colonias transformadas son aisladas antes del cultivo de las células transformadas a una temperatura no permisiva para permitir la comprobación de la integridad en el ADN transformante. A continuación, se cultivan células de una o varias colonias individuales a una temperatura no permisiva para permitir la selección de integrantes.

30 De acuerdo con la invención, un ADN de interés es clonado en un sistema plásmido termosensible conteniendo un replicón pSH71 (GenBank Número de Acceso A09338) o un homólogo del mismo. Un replicón pSH71 es un replicón que proporciona una funcionalidad de replicación termosensible.

35 Una funcionalidad de replicación termosensible proporciona replicación de un plásmido que contiene el replicón a una temperatura permisiva y falta de replicación de dicho plásmido a una temperatura no permisiva. Esta funcionalidad de replicación termosensible del replicón pSH71 es proporcionada por un origen de replicación y una proteína de replicación (RepA), que es codificada por el replicón.

40 En el contexto de esta invención, un "replicón pSH71 o un homólogo del mismo" se define como un ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido que tiene una funcionalidad de replicación termosensible (la proteína RepA) y teniendo una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 80% a SEQ ID NO: 1, preferentemente 90% idéntica, más preferentemente 95, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica. El replicón pSH71 o un homólogo del mismo comprende además un origen de replicación en el que la proteína RepA que se ha definido anteriormente es capaz de actuar. Un ejemplo de un homólogo del replicón pSH71 es pWV01 (GenBank Número de Acceso X56954). El replicón pSH71 o un homólogo del mismo puede comprender además una proteína reguladora (RepC).

45 Para los efectos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se refiere al porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias. El grado de identidad se determina utilizando el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul, y otros, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). Software para llevar a cabo el análisis BLAST es disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determina la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST utiliza como carencias la longitud de una palabra (W) de 11, la matriz de calificación BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.

50 Cuando se intenta la integración cromosómica de un ADN transformante, la disponibilidad de un plásmido de integración con un replicón condicional es deseable. Este plásmido puede ser introducido en condiciones permisivas, después de lo cual las condiciones de crecimiento se pueden cambiar (por ejemplo, por un desplazamiento a una temperatura no permisiva), haciendo al plásmido no replicante y permitiendo la selección de eventos de integración cromosómica provocados por recombinación homóloga o no homóloga. Como vector de clonado condicional se puede utilizar un replicón termosensible, tal como pSH71 presente en pNZ124, o plásmidos esencialmente idénticos (homólogos) del mismo o derivados del mismo que han conservado las propiedades termosensibles del plásmido. Las temperaturas permisibles para este replicón en especie *Bacillus* moderadamente termofílica que es facultativamente anaeróbica y homoláctica, se encuentran preferentemente entre 37 y 50°C. Las temperaturas no permisivas se encuentran preferentemente por encima de 50°C. Las temperaturas permisivas y no permisivas pueden depender, no solamente del replicón, sino también de la especie *Bacillus* huésped. Éste último

es un fenómeno conocido de la técnica anterior, por ejemplo, plásmidos pG+host, para el cual 37°C es una temperatura permisiva en *LactoBacillus delbrueckii*, pero temperatura no permisiva para *Lactococcus lactis* (ver US 5919678).

5 Los vectores de clonado condicional pueden ser obtenidos también como derivados termosensibles de pNW33n u otros plásmidos capaces de replicar en especie *Bacillus* moderadamente termofílica que son facultativamente anaeróbicos y homolácticos.

10 Un ADN de interés clonado en un sistema plásmido termosensible, conteniendo un replicón pSH71 o un homólogo del mismo, es introducido en células de especie *Bacillus* moderadamente termofílicas que son facultativamente anaeróbicas y homolácticas por:

- A. transformación de protoplastos o fusión de protoplastos,
- B. electroporación,
- 15 C. transformación biolística,
- D. conjugación, o bien
- E. transformación de células naturales competentes.

20 La transformación de estas especies *Bacillus* por electroporación se puede conseguir por una descarga de alto voltaje a través de una suspensión que contiene una especie *Bacillus* moderadamente termofílica que es facultativamente anaeróbica y homoláctica, y un ADN transformante adecuado comprendiendo la funcionalidad deseada y/o secuencias en ADN homólogas para secuencias genómicas de la especie *Bacilli*.

25 La transformación de esta especie *Bacillus* por conjugación, se puede conseguir por contacto de una población de la especie *Bacillus* moderadamente termofílica que es facultativamente anaeróbica y homoláctica con (población de) una célula donante que contiene plásmido auto-transmisible o movilizable, que tiene la funcionalidad deseada. Los plásmidos auto-transmisibles codifican todas las funciones que necesitan para desplazarse entre las células, y en algunos casos también ayudan en la transferencia de ADN cromosómico y plásmidos movilizables. Los plásmidos movilizables no codifican todas las proteínas requeridas para transferencia, y como consecuencia necesitan que esas funciones sean proporcionadas por el genoma donante (codificado por cromosoma o plásmido). Los plásmidos movilizables contienen, como mínimo, una ración origen de transferencia (*oriT*). Cualquier célula donante que pueda ser co-cultivada con el *Bacillus* moderadamente termofílico a modificar es, en principio, adecuada para servir como célula donante. Son ejemplos de células donantes apropiadas las de la especie *Bacillus*, incluyendo *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. lautus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. smithii*, *B. subtilis*, *B. thermoamylovorans*, *B. thuringiensis*, *GeoBacillus stearothermophilus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *LactoBacillus species*, incluyendo *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. crispatus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. sanfriscensis*, *Streptococcus species, including S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, y *S. thermophilus*. Se incluye entre los plásmidos auto-transmisibles adecuados pRK24, pLS20, pAMβ1 o plásmidos esencialmente idénticos a los mismos o un derivado de los mismos que ha retenido la capacidad auto-transmisible del plásmido. Se incluye entre los plásmidos movilizables adecuados pAT18, pAT28, pJS28 o un plásmido esencialmente idéntico al mismo o un derivado del mismo que ha conservado la capacidad movilizante del plásmido.

45 Los inventores han conseguido además desarrollar un protocolo de transformación natural para estas especies de *Bacillus*. Esto requirió la determinación de la composición apropiada del medio para crecimiento, inanición y transformación, temporización adecuada para desarrollo y recogida de células competentes y proceso de transformación apropiado. Si bien no se conoce la transformación natural extendida entre especies de *Bacillus*, los inventores han descubierto que bacilos moderadamente termofílicos que son facultativamente anaeróbicos y homolácticos pueden ser transformados en naturalmente competentes.

50 Para electroporación y transformación de protoplastos, la fuente del ADN transformante puede influir en el resultado de la transformación. La fuente de ADN a transformar (aislado de *Lactococcus lactis* MG 1363, *Escherichia coli* DH5α, *E. coli* JM109, o *E. coli* JM110) no afectó las eficiencias de transformación en la presente especie de *Bacillus*, indicando que el estado de metilación del ADN no es importante. Esto contrasta con otras especies de *Bacillus* (ver por ejemplo, WO 02/29030).

60 En una realización preferente de la invención, el ADN transformante para introducción en *Bacillus* es aislado de *Lactococcus lactis*. De manera más preferente, las etapas de clonado para construir el ADN transformante se llevan a cabo también en *Lactococcus lactis*. La razón de ello, es que el clonado en *E. coli* mostró frecuentemente resultar en deleciones y/o reestructuraciones en el ADN clonado.

65 Con la presente invención, se dan a conocer métodos para transformación por, preferentemente, inducción de competencia natural, transformación de células electrocompetentes y conjugación, se demuestra la utilización de un plásmido termosensible y la aplicación de estos elementos para la producción de especies *Bacillus* de ingeniería

genética, moderadamente termofílica que son facultativamente anaeróbicas y homolácticas, por ejemplo para la producción de R-lactato.

5 El ADN transformante contiene un replicón pSH71 o un homólogo del mismo y un ADN de interés capaz de proporcionar una funcionalidad deseada de las células de *Bacillus*.

10 La modificación cromosómica es la modificación preferente de la especie de *Bacillus* moderadamente termofílica que es facultativamente anaeróbica y homoláctica, dado que la modificación cromosómica asegurará una distribución estable de dicha funcionalidad sobre las células de progenia. La introducción de una funcionalidad deseada en el cromosoma se puede llevar a cabo con recombinación no homóloga y también con recombinación homóloga. La recombinación homóloga es preferente dado que presenta la oportunidad de introducir, eliminar o introducir simultáneamente y eliminar una funcionalidad.

15 En el contexto de la invención, una funcionalidad puede ser un gen que codifica un polipéptido deseado a producir por la célula y/o un gen que codifica un polipéptido involucrado en la producción de un metabolito primario o secundario por la célula y/o una secuencia de ADN que posibilita la delección de una secuencia de ADN del cromosoma de la célula.

20 Se dan a conocer genes que codifican polipéptidos con secuencias reguladoras funcionales en la célula, por ejemplo, una secuencia promotora. Las secuencias reguladoras pueden ser secuencias asociadas de forma nativa con la secuencia de codificación o pueden ser heterólogas con respecto a la misma.

25 Un gen que codifica un polipéptido puede ser fusionado a cualquier secuencia promotora que funciona en la especie *Bacillus* elegida. Las secuencias de promotora adecuadas incluyen promotores que se pueden obtener de la especie *Bacillus* escogida, promotores híbridos derivados de diferentes promotores *Bacillus* nativos y promotores artificiales. Un promotor preferente es el promotor de un gen *Bacillus* a inactivar por recombinación homóloga. Es especialmente preferente el promotor *ldhL* de *Bacillus coagulans* o el promotor del gen de amilasa, tal como se da a conocer en el documento US 5171673.

30 Para posibilitar la selección de células *Bacillus* transformadas a partir de la mayoría de células sin transformar, un marcador de selección forma parte del ADN transformante. El marcador de selección puede encontrarse presente en el mismo fragmento de ADN o plásmido que la funcionalidad de interés o en un fragmento ADN o plásmido separado. Un marcador de selección preferente es el gen *cat* que codifica para cloramfenicol acetiltransferasa a partir de pMH3.

35 Las funcionalidades deseadas que pueden ser introducidas son la producción de ácido R-láctico, tal como se describe más adelante, y otras funcionalidades para proporcionar la producción de compuestos que son metabolizables a partir de piruvato. Son ejemplos de estos compuestos piruvato, acetolactato, diacetil, acetoína, 2,3-butanodiol, 1,2-propanodiol, acetato, formato, acetaldehído, etanol, L-alanina, oxaloacetato, S-malato, succinato, fumarato, 2-oxoglutarato, oxalosuccinato, isocitrato, citrato, glioxilato.

40 Cuando se intenta la recombinación homóloga, el ADN transformante contiene además una secuencia de ADN que es homóloga con respecto a una secuencia diana genómica del *Bacillus* específico a conseguir por ingeniería. El técnico en la materia comprenderá que no es necesaria la identidad al 100% para obtener recombinación homóloga. Un porcentaje de identidad de 90% aproximadamente, será también suficiente. De manera general, la secuencia de ADN de interés a insertar en el cromosoma por recombinación homóloga está flanqueada por secuencias homólogas con suficiente longitud para posibilitar la recombinación homóloga. Esta longitud puede ser, como mínimo, de unos 200 bp, por ejemplo, entre 200 y 1500 bp, preferentemente entre 200 y aproximadamente 1000 bp.

50 La presente invención está dirigida a la modificación por medio de ingeniería genética de especies *Bacillus* moderadamente termofílicas que son facultativamente anaeróbicas y homolácticas, en las que se introduce una funcionalidad deseada, preferentemente por recombinación homóloga.

55 La presente invención está dirigida también a la modificación por medio de ingeniería genética de especies *Bacillus* moderadamente termofílicas que son facultativamente anaeróbicas y homolácticas en las que la funcionalidad no deseada es eliminada por recombinación homóloga.

60 La invención está dirigida además a la modificación por medio de ingeniería genética de especies *Bacillus* moderadamente termofílicas, que son facultativamente anaeróbicas y homolácticas, en las que se introduce una funcionalidad deseada en el cromosoma y al mismo tiempo se elimina una funcionalidad no deseada por recombinación homóloga.

65 Las cepas de *Bacillus* moderadamente termofílicas de ingeniería genética que son facultativamente anaeróbicas y homolácticas o derivadas de una cepa parental que es homoláctica, tal como se define en la reivindicación 11, se pueden obtener por dicha modificación por medio de ingeniería genética formando otro aspecto de la invención. La modificación por medio de la ingeniería genética incluye la introducción de una funcionalidad, eliminación de una

funcionalidad o introducción simultánea de una funcionalidad y eliminación de una funcionalidad del cromosoma bacteriano.

5 En una realización preferente, la modificación por medio de ingeniería genética tiene lugar por recombinación homóloga.

10 En otra realización preferente, el derivado de ingeniería genética de una especie de *Bacillus* moderadamente termofílica que es facultativamente anaeróbica y homoláctica es una cepa en la que el gen *ldhL* que codifica para actividad S-lactato dehidrogenasa, es sustituida por un gen que codifica para una 2-hidroxiácido dehidrogenasa dependiente de NADH que tiene actividad de R-lactato dehidrogenasa por recombinación homóloga.

15 El constructor que es utilizado para recombinación homóloga contiene un gen *ldhL* defectivo que no codifica una encima S-lactato dehidrogenasa funcional. Un gen *ldhL* defectivo puede ser proporcionado por un constructo en el que una parte o la totalidad de la secuencia que codifica *ldhL* sea anulada.

20 Un gen *ldhL* defectivo puede ser creado sustituyendo una parte o la totalidad del gen *ldhL* con otro gen, por ejemplo un gen que codifica un marcador de selección o un gen de interés. Preferentemente, el gen *ldhL* que codifica para actividad de S-lactato dehidrogenasa es sustituido por un constructor que contiene un gen que codifica para 2-hidroxiácido dehidrogenasa dependiente de NADH que tiene actividad de R-lactato dehidrogenasa, incluyendo enzimas con número EC 1.1.1.28.

25 Genes adecuados que codifican para la actividad de R-lactato dehidrogenasa son genes capaces de complementar un mutante *E. coli* *ldhA*, tal como *E. coli* FMJ144, que se describe por Bernard y otros (Ver Bernard, N., T. Ferrain, D. Garmyn, P. Hols, y J. Delcour, 1991: Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii subsp.* bulgaricus by complementation in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 290:61-64). Un *ldhA* adecuado que codifica para actividad de R-lactato dehidrogenasa, es por ejemplo en gen *ldhA* de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (ver también Bernard y otros) or the *hdhD* gene from the same species (Bernard, N., K. Johnsen, T. Ferain, D. Garmyn, P. Hols, J.J. Holbrook, y J. Delcour. 1994. NAO+-dependent D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Eur. J. Biochem. 224:439-446). La secuencia de aminoácidos de la R-lactato dehidrogenasa codificado por el gen *ldhA* es representado en la secuencia SEQ ID NO: 2. Se observ que los polipéptidos codificados por genes capaces de la complementación del anterior mutantede *E. coli* difieren sustancialmente en la secuencia de aminoácidos. Es factible un porcentaje de identidad bajo, del orden del 30% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los genes *ldhA* y *hdhD* parecen codificar proteínas con un grado de identidad de 50%, aproximadamente.

35 Genes adecuados que codifican para actividad de R-lactato dehidrogenasa, son los genes que codifican una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los genes homólogos que codifican una secuencia de aminoácido que muestra un grado de identidad de, como mínimo 30%, más preferentemente un mínimo de 40%, incluso más preferentemente, como mínimo, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% a la secuencia de aminoácidos de secuencia SEQ ID NO: 2 y que son capaces de complementar un mutante *E. coli* *ldhA*, tal como *E. coli* FMJ144. Estas secuencias homólogas pueden comprender polimorfismos que pueden existir en células de diferentes poblaciones o dentro de una población debido a variación natural alélica o intra-cepa. Se puede derivar adicionalmente un homóloga a partir de una especie de *Bacillus* distinta de la especie de la que se origina el ADN especificado o secuencia de aminoácidos o se puede diseñar artificialmente y sintetizar.

45 Además de introducir funcionalidades deseadas, la ingeniería genética puede ser utilizada para optimizar la fermentación industrial, por ejemplo, para posibilitar la fermentación de sustratos económicos, tales como azúcares derivados de lignocelulosa incluyendo xilosa y arabinosa y/o eliminar las funcionalidades no deseadas.

50 En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la producción de un compuesto de interés, tal como se define en la reivindicación 12, que comprende el cultivo de la cepa obtenida por ingeniería genética del aspecto anterior en condiciones que conducen a la producción de dicho compuesto.

55 Descripción de las figuras

La figura 1 muestra análisis de restricción de pNW33N aislado de tres aislados de *E. coli* que fueron transformados con material plásmido aislado de *B.coagulans* DSM1 aislado transformado. Las vías 1, 4, y 7. pNW33N digerido con *EcoRI*; fragmento de 4217-bp. Vías 2, 5, y 8. pNW33N digerido con *EcoRI-StuI*; fragmentos de 333-bp y 3884-bp. Vías 3 y 6. ADN Kb en escalera (Stratagene) 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1,0 kb, 1,5 kb, 2,0 kb, 3,0 kb, 4,0 kb, 5,0 kb, 6,0 kb, 7,0 kb, 8,0 kb, 9,0 kb, 10,0 kb, y 12,0 kb.

60 La figura 2 muestra un mapa de plásmido de pJS28. El gen de replicación (*repB*) y el gen de resistencia a cloramfenicol (*cat*) se han mostrado mediante flechas. El plásmido IncP plásmido RK2 origen de transferencia (*oriT*) y el *E. coli* origen de replicación (*ori*) se han mostrado como zonas recuadradas.

La figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos de *B. coagulans* sintético ATCC 23498 región promotora de amilasa basada en la secuencia que se da a conocer en el documento US 5171673. Los lugares de clonado *Bg*/II (AGATCT), *Bam*HI (GGATCC), y *Nco*I (CCATGG) se han subrayado. El lugar *Nco*I permite la fusión translacional al promotor de amilasa. El codón inicial ATG del gen de amilasa se ha mostrado en negritas.

5 La figura 4 muestra un mapa de plásmido de pJS25. Los genes de replicación (*repA* y *repC*), el gen de resistencia a cloramfenicol sin el lugar *Nco*I (cm*) se han indicado por flechas. La zona promotora de *B. coagulans* (P) se ha mostrado como zona recuadrada.

10 La figura 5 muestra un mapa de plásmido de pJS26. Los genes de replicación (*repA* y *repC*), el gen de resistencia a cloramfenicol sin lugar *Nco*I (cm*), y el gen LMG 6901 *ldhA* (*ldhA* 6901) se han indicado por flechas. La zona promotora de *B. coagulans* (P) está recuadrada.

15 La figura 6 muestra el mapa de plásmido de pJS27. El gen de replicación (*repB*), el gen de resistencia a cloramfenicol (*cat*) y el gen *L. bulgaricus* LMG 6901/*dha* (*ldhA* 6901) se han mostrado mediante flechas. La región promotora de *B. coagulans* (P) y el origen de *E. coli* de replicación (*ori*) se han mostrado como zonas recuadradas.

20 La figura 7 muestra un mapa de plásmido de pRK1. Los genes de replicación (*repA* y *repC*), el gen de resistencia a cloramfenicol (*cat*) y el gen *L. bulgaricus* *ldhA* (*ldhA*) se han mostrado por flechas. La región promotora de *B. coagulans* (Pamy ATTC) y *B. coagulans* *ldhL* y las zonas más arriba y más abajo de *B. coagulans* *ldhL* se han mostrado como zonas recuadradas.

La presente invención se explica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

25 EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos y cepas

30 El plásmido pNZ124 (Platteeuw, C., G. Simons, and W. M. de Vos. 1994. Use of the *Escherichia coli* β -glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:587-593) fue obtenido a partir de investigación de alimentos de NIZO. Se basa en el vector de clonado pNZ12 que se da a conocer en el documento EP 0228726 B1.

35 El plásmido pNW33N (Zeigler, D.R. 2001: The genus *GeoBacillus*: introduction and strain catalog, 7th ed., vol. 3. *Bacillus* Genetic Stock Center. www.bgsc.org) fue obtenido del centro de almacén genético (Genetic Stock Center) de *Bacillus*, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA, y propagado en *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen Life Technologies). La secuencia de nucleótidos de pNW33N se puede conseguir de GenBank con el número de acceso AY237122.

40 El plásmido pATAS28 conteniendo el IncP plásmido RK2 origen of transferencia (*oriT*) (Namy, O., M. Mock, A. Fouet, 1999: Co-existence of *clpB* and *clpC* in the Bacillaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 297-302) fue obtenido del Institute Pasteur. *B. coagulans* DSM 1 fue obtenido de DSMZ, *Braunschweig*, Alemania.

45 El *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 fue descrito por Gasson (M. J. Gasson. 1983: Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154:1-9). El *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LMG 6901 fue obtenido de la colección de bacterias BCCM/LMG, Gante, Bélgica.

50 El *E. coli* HB101 conteniendo pRK24 fue descrito por Trieu-Cuot, y otros, (Trieu-Cuot, P., C. Carlier, P. Martin, y P. Courvalin, 1987: Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 48:289-294).

55 *Condiciones de Cultivo*

60 El *B. coagulans* fue cultivado de manera rutinaria a 45°C en condiciones aeróbicas en caldo BC (BC significa *B. coagulans*) conteniendo 10g/L de extracto de levadura, 2g/L de di-amoniofosfato, 3,5g/L de di-amoniosulfato, 10 g/L de tampón Bis-Tris (bis[2-hidroximetil]iminotris[hidroximetil]-metano), 3 mg/L CaCl₂, 5 mg/L MgCl₂; si es apropiado el medio, fue suplementado con 50 g/L de sacarosa; el pH fue ajustado a 6,6 - 6,7 y el medio fue sometido a autoclave (20 minutos 121°C) antes de utilización. Para las placas, el medio fue suplementado con 10 g/L Gelrite y 1 g/L MgCl₂. Se añadieron elementos en trazos exteriorizados por filtrado de manera separada. Las concentraciones finales fueron: 0,2 mg/L CoCl₂ · 6 H₂ O, 0,01 mg/L CuCl₂ · 2 H₂ O, 0,3 mg/L H₃ BO₃. 0,03 mg/L Na₂ MoO₄ · 2 H₂ O, 0,02 mg/L NiSO₄ · 6 H₂ O, 0,03 mg/L MnCl₂ · 4 H₂ O, 0,05 mg/L ZnCl₂. Si es apropiado, los

65 medios fueron suplementados con cloramfenicol esterilizado por filtro a 7 mg/L. El medio de competencia (caldo C)

5 contenía 0,05 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de di-fosfato amónico, 3,5 g/L de di-sulfato amónico, 10 g/L de glucosa, 10 mg/L CaCl₂, 0,5 g /L KCl, 25 mg/L MgCl₂; el pH fue ajustado a 6,8 y el medio fue sometido a autoclave (20 minutos 121°C) antes de utilización. Se añadieron separadamente elementos de trazos exteriorizados por filtrado y vitaminas. Las concentraciones finales fueron: 2,4 mg/L CoCl₂, 3,6 mg/L FeCl₃, 3 mg/L MnCl₂, 1,2 mg/L ZnCl₂, 0,024 mg/L biotina, 0,012 mg/L tiamina, 20 mg/L metionina. El medio de transformación (caldo T) era caldo C con 0,025 g/L de extracto de levadura en vez de 0,05 g/L.

10 Se cultivó *E. coli* de manera rutinaria en caldo LB (Molecular Cloning, manual de laboratorio, era edición. J. Sambrook y D. W. Russell. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) a 37°C en condiciones aeróbicas. En caso apropiado, se utilizaron cloramfenicol y/o ampicilina con concentraciones respectivamente de 5 mg/L y 100 mg/L.

15 El *L. bulgaricus* fue cultivado de forma rutinaria en caldo MRS ® (BD Biosciences) a 37°C en condiciones anaeróbicas.

El *L. lactis* fue cultivado de forma rutinaria en caldo M17 ® (BD Biosciences) suplementado con 0,5% de glucosa a 30°C en condiciones anaeróbicas. En caso apropiado, se utilizó cloramfenicol con una concentración de 5 mg/L.

20 *Técnicas de manipulación de ADN*

Se llevaron a cabo técnicas de manipulación de ADN estándar, tal como se describe por Sambrook y Russell (J. Sambrook y D. W. Russell. 2001: Molecular Cloning, manual de laboratorio. 3ra edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

25 La construcción de los derivados de pNZ124 y pNW33N fue llevada a cabo en el *L. lactis* y *E. coli*, respectivamente.

30 El aislamiento a gran escala de AND plásmido de *E. coli* a partir de 100 mL de cultivo fue llevada a cabo utilizando el Jetstar 2.0 Plasmid Maxiprep Kit ® (Genomed) siguiendo las instrucciones del fabricante. El aislamiento a pequeña escala de ADN plásmido de *E. coli* a partir de 1 mL de cultivo, fue llevado a cabo utilizando el kit Nucleospin Plasmid Quick Pure ® (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

35 El aislamiento de ADN plásmido de *B. coagulans* fue llevado a cabo utilizando centrifugación en equilibrio en gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidio. Se recogieron, por centrifugación, dos cultivos de una noche de 300 mL cultivados en condiciones aeróbicas (170 rpm) a 45°C. Los gránulos de células fueron reunidos y resuspendidos en 7 mL de un tampón que contenía 2 mg/mL de lisozima 30 mM Tris/HCl, pH 8.0, 3 mM MgCl₂, y 25% de sacarosa, y fue incubado durante 15 minutos sobre hielo. Las células fueron sometidas a lisis por adición de 16 mL de una solución que contenía 0,2 M NaOH y 1% SDS. Después de 5 minutos de incubación sobre hielo, la muestra fue neutralizada por adición de 12 mL de 3M Kac y mezcla. Los precipitados fueron eliminados por centrifugación. Los ADN de los sobrenadantes fueron precipitados por adición de 20 mL de isopropanol. Los ADN fueron recogidos en gránulos por centrifugación, secados y disueltos en tampón TE conteniendo 1,0 g/mL CsCl y 0,4 mg/mL de bromuro de etidio. Los ADN cromosómicos y plásmidos fueron separados por gradientes de densidad de cloruro de cesio utilizando un rotor vertical (Stepsaver 65 V13 ®; Sorvall) a 45000 rpm durante 16 horas. El ADN plásmido fue recogido y se retiró el bromuro de etidio, tal como se describe en otros lugares (Molecular Cloning, manual de laboratorio. 3ra edición. J. Sambrook y D. W. Russell. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

50 El aislamiento de AND plásmido de *L. lactis* y *B. coagulans* a pequeña escala de 10 mL de cultivo fue llevado a cabo siguiendo un protocolo mini-prep para bacterias Gram positivas (Rapid mini-prep isolation of high quality plasmid DNA from Lactococcus and LactoBacillus spp. D. J. O'Sullivan y T. R. Klaenhammer. 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59:2730-2733).

55 Células de *E. coli* fueron preparadas utilizando cloruro cálcico y fueron transformadas por choque térmico, tal como se describe por Sambrook y Russell (Molecular Cloning, manual de laboratorio. 3ra edición. J. Sambrook and D. W. Russell. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

60 El *L. lactis* fue transformado por electroporación, tal como se describe por Holo y Nes (High-frequency transformation by electro-poration of Lactococcus lactis subsp. cremoris grown with glycine in osmotically stabilized media. 1989. Holo, H., y I. F. Nes. Appl. Environ. Microbiol. 55:3119-3123).

Se llevaron a cabo reacciones PCR para clonado con la polimerasa Pwo (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

65 El análisis PCR de colonias fue utilizado para demostrar la presencia de pNW33N en colonias resistentes a cloramfenicol. Se diseñaron cebadores PCR para identificación del gen de replicación de pNW33N *repB* con las

secuencias 5'-TCGCCT-TCTTCTGTGTCATC-3' y 5'-CTGGAGGAGAGCAATGAAAC-3'. Se recogieron las colonias con un mondadientes, y se transfirió un poco de material celular a un tubo de reacción PCR de 0.5 mL. Las células fueron sometidas a rotura mediante incubación durante 1 minuto a 1000 W en un horno de microondas. Se prepararon mezclas de reacción PCR de 50 μ L con rTaq polimerasa (Amersham Biosciences) y 0.5 μ g de cada cebador, según recomendación del fabricante, y se añadieron a tubos de reacción con las células troceadas. Se llevaron a cabo reacciones PRC en un RoboCycler® (Stratagene). Un periodo de incubación de 4 minutos a 94°C fue seguido por 25 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturalización, 1 minuto a 58°C para reasociación del cebador, y 1 minuto a 72°C para elongación. Después del ciclo final, la mezcla de reacción fue incubada a 72°C durante otros 5 minutos.

Electroporación

La preparación de células electrocompetentes requirió la determinación de las condiciones de cultivo más apropiadas, tiempo de recogida, y tiempo de composición de los tampones de lavado y de electroporación. Si bien, *B. coagulans* DSM 1 es capaz de crecer en caldo LB, el caldo BC desarrollado aumentó los rendimientos de electroporación. Se añadió glicina para producir la pared celular, y las concentraciones fueron optimizadas. Las concentraciones de glicina se encontraban entre 0,5 y 2,0% y preferentemente, entre 1,0 y 1.5%. Las células fueron recogidas en una fase adelantada "mid-log" para obtener resultados óptimos. El tampón de electroporación tenía un pH comprendido entre 4,3 y 6,0 y preferentemente, entre 4,3 y 5,0. Los ajustes óptimos de electroporación (voltaje, resistencia, capacitancia) también se tuvieron que determinar. El voltaje se encontraba preferentemente entre 1,0 y 2.5 kV, y más preferentemente entre 1,25 y 2,0 kV. La resistencia se encontraba preferentemente entre 100 y 800 Ω , y más preferentemente entre 200 y 600 Ω . Es importante la recuperación antes de aplicación en placas sobre un medio selectivo y tuvo lugar, como mínimo, 2 horas, y preferentemente 3 horas.

Células electrocompetentes de *B. coagulans* fueron preparadas del modo siguiente. Se utilizó un cultivo durante una noche para inocular (5% volumen/volumen) 50 mL de medio suplementado con 1% de glicina (resultando en una turbidez a 600nm de aproximadamente 0,13-0,14). Después de 2,5 horas de incubación aeróbica a 45°C, se recogieron las células por centrifugado. Se lavaron los gránulos de células dos veces con 50 mL y 25 mL, respectivamente, de tampón de electroporación enfriado en hielo (5 mM KH₂ PO₄, 0,4 M sorbitol, 10% glicerol, 4 mM MgCl₂ ajustado a pH 4,5), y resuspendido en 1 mL de tampón de electroporación enfriado en hielo. Para electroporación, se mezcló 100 μ L de la suspensión de células con 1 μ g de ADN plásmido y se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad®) que fue pre-enfriada sobre hielo. La muestra fue sometida a impulsos de 1,6 kV a 200 Ω y 25 μ F utilizando un Gene Pulser y aparato Pulse Controller (Bio-Rad®). Inmediatamente después de electroporación, se añadió 1 mL de medio y las células fueron incubadas durante 3 horas a 45°C en un Thermomixer® (Eppendorf) a 900 rpm, después de lo cual fueron aplicadas en placas suplementadas con cloramfenicol. Las placas fueron incubadas a 45°C durante 1 o 2 días en condiciones aeróbicas.

Conjugación

Se utilizaron filtrados para transferencia conjugada de plásmidos recombinantes de *E. coli* a *B. coagulans*. Se reunieron células de crecimiento logarítmico de donante (2 mL) y receptor (2 mL) y utilizando una jeringa, fueron aplicados a un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μ m (Schleiger & Schuell) esterilizado en un soporte de filtro de plástico (Schleiger & Schuell). Las células fueron lavadas con 10 mL de caldo BC y los filtros fueron secados forzando aire a través del filtro. Los filtros fueron colocados sobre la superficie de placas BC sin antibióticos, e incubadas durante una noche a 45°C. Después, las células fueron resuspendidas desde el filtro en caldo BC y series de dilución fueron aplicadas en placas BC conteniendo 7 mg/L de cloramfenicol e incubadas a 55°C aeróbicamente durante 1-2 días.

Análisis de enzima

Se determinó la sobreproducción de enzima en *B. coagulans* utilizando promotor de *B. coagulans* en cultivos de crecimiento exponencial. Las células fueron recogidas por centrifugación. Se prepararon extractos libres de células utilizando un aparato FastPrep FP120® (Qbiogene) en dos pasadas de 30 segundos a velocidad 4. Las células fueron enfriadas sobre hielo durante 1 minuto entre las pasadas. El contenido de proteínas fue determinado por el método de Bradford (Bio-Rad) utilizando albúmina de suero bovino como norma. Se llevó a cabo SDS-PAGE (12,5%), tal como se describe por Sambrook y Russell (Molecular Cloning, manual de laboratorio. 3ra edición. J. Sambrook y D. W. Russell. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) utilizando el sistema de electroforesis Protean II (Bio-Rad).

Se determinaron las actividades específicas de dehidrogenasa de R-lactato de forma espectrofotométrica a 340 nm y se llevó a cabo a 50°C, utilizando 1 ml de una mezcla de ensayo que contenía 0,3 M de tampón de glicilglicina pH 10, 0,25% (v/v) Triton X-100, 5 mM NAD, y 1% R-lactato. La reacción fue iniciada por la adición de 40 o 50 μ L de extracto libre de células. Se expresaron las actividades específicas como $\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, en la que

ΔA es el incremento de absorbancia a 340 nm durante una longitud de trayectoria de 1 cm y mg es la cantidad de proteína.

Fermentaciones

5 Se llevaron a cabo fermentaciones por lotes en un bioreactor (7 L Applikon ®) con 4 L de caldo BC sin tampón Bis-Tris y suplementado con 30 g/L de glucosa. Se transfirió un cultivo aeróbico de una noche (40 mL) cultivado a 50°C e inoculado a partir de glicerol a 360 mL de caldo BC reciente e incubado durante otras 4-5 horas. Estos 400 mL fueron utilizados para inocular el bioreactor. El mantenimiento del pH se consiguió por adición automática de una
10 solución de cal al 20% (peso/volumen). La fermentación fue llevada a cabo a 54°C, pH 6,5 y velocidad de agitación de 250-300 rpm. El control de la temperatura fue llevado a cabo con un baño de agua (Lauda), mientras que la lectura/control de pH fue llevada a cabo mediante un aparato ADI 1020 Bio-Processor (Applikon ®). Todos los datos (pH y consumo base) fueron procesados por captación de datos en línea (Applikon FM V5.0 ®). Las muestras fueron retiradas antes de inoculación, y al final de la fermentación para medición de ácido R- y S- láctico
15 y posibles subproductos. Las muestras fueron centrifugadas y los residuos restantes fueron retirados por filtrado utilizando un filtro Millex GP 0,22 µm filter ® (Millipore). El filtrado fue almacenado a -21°C hasta análisis posterior.

Se midieron los ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico) utilizando derivatización y GLC. Los R- y S- lactatos fueron metilados a metil-lactato y medidos por análisis del espacio de
20 cabecera en una columna quiral.

RESULTADOS

25 EJEMPLO 1. Transformación de *B. coagulans* con plásmido pNW33N utilizando células competentes naturales

1) Preparación de células competentes de *B. coagulans* DSM 1

Se utilizaron los siguientes procedimientos en tres experimentos independientes. Se cultivó *Bacillus coagulans*
30 DSM 1 durante una noche a 45°C en 5 ml de caldo BC en condiciones aeróbicas. Este cultivo fue utilizado para inocular 25 ml de caldo C precalentado, resultando en una turbidez a 600 nm de 0,15. El cultivo reciente fue incubado aeróbicamente a 45°C hasta que se alcanzó turbidez a 600 nm entre 0,9 - 1,2 (Tabla 1).

35 2) Transformación de *B. coagulans* DSM 1 con pNW33N

Una parte de 0,5 mL de las células competentes fueron reducidas a gránulos, y el gránulo fue resuspendido en 0,1 mL de caldo T y mezclado con 5 µg ADN plásmido de pNW33N. Después de 1,5 horas de incubación a 45°C en un Thermomixer (Eppendorf) a 900 rpm, se añadieron 0,3 mL de caldo BC precalentado y se continuó la incubación durante 2 horas, después de lo cual las células fueron aplicadas en placas sobre placas BC suplementadas con 7
40 mg/L de cloramfenicol. Las placas fueron incubadas aeróbicamente a 45°C. Después de 3 días de incubación, aparecieron colonias (Tabla 1).

TABLA 1: Transformación natural de *B. coagulans* DSM 1

| turbidez a 600 nm | número de colonias |
|-------------------|--------------------|
| 0,92 | 24 |
| 0,97 | 3 |
| 1,16 | 2 |

45 3) Aislamiento de plásmido de *B. coagulans* DSM 1

Las colonias fueron transferidas a placas BC recientes suplementadas con 7 mg/L de cloramfenicol para incubación durante una noche a 45°C. Se utilizó PCR de colonias para detectar la presencia del gen *repB* del plásmido pNW33N. Todas las reacciones PCR facilitaron un producto de las dimensiones esperadas. Una colonia de cada
50 experimento fue transferida a caldo BC para incubación O/N y aislamiento de plásmido miniprep. Si bien no se pudo visualizar ADN plásmido mediante electroforesis de gel de agarosa, la transformación de *E. coli* DH5α con ADN miniprep, resultó en transformantes de los que se podía recuperar pNW33N. El ADN plásmido fue digerido con EcoRI-StuI para confirmar la integridad de pNW33N. Los modelos de restricción fueron los esperados (Figura 1) demostrando que el plásmido pNW33N se transformaba en *B. coagulans* DSM 1.

EJEMPLO 2. Transformación de *B. coagulans* con plásmido pNW33N utilizando electroporación

Se transformó *B. coagulans* DSM 1 rutinariamente con 1 µg de plásmido pNW33N por electroporación. De manera típica, después de 1 día de incubación a 45°C aparecieron más de 20 colonias sobre placas que contenían cloramfenicol. En un experimento, se transfirieron 15 colonias a placas recientes que contenían cloramfenicol, después de 2 días de incubación. Después de 24 horas de incubación a 45°C se confirmó la transformación por análisis PCR de colonias utilizando cebadores específicos *repB*. Se obtuvieron productos de PCR de las dimensiones esperadas para todos los transformantes sometidos a prueba, demostrando que el gen *repB* de pNW33N se encontraba presente. Se utilizó *B. coagulans* DSM 1 como control negativo, y no proporcionó productos PCR. Se aisló ADN plásmido de un solo transformante a partir de un gradiente de cloruro de cesio. Se digirió ADN plásmido con *EcoRI* y con *EcoRI*-Stul para confirmar la integridad de pNW33N. Los modelos de restricción fueron los esperados (fragmentos 333-bp y 3884-bp) demostrando que el plásmido pNW33N se había transformado en *B. coagulans* DSM 1.

EJEMPLO 3. Transformación de *B. coagulans* con plásmido pNW33N utilizando conjugación.

1) Construcción de un derivado de pNW33N que contiene un origen de transferencia

El origen de transferencia (*oriT*) del plásmido IncP RK2 fue clonado en pNW33N. Esto permite la co-movilización efectiva por cualquier plásmido IncP autotransferible co-residente en donantes de *E. coli* (transferencia de plásmido por conjugación a partir de *Escherichia coli* a bacterias Gram-positivas). Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Martin, P., y Courvalin, P. 1987. FEMS Microbiol. Lett. 48:289-294). La región RK2 *oriT* fue clonada como fragmento romo 0,5-kb *AccI*-Avall derivado de pAT S28 en pNW33N digerido con *SmaI*. El plásmido resultante, pJS28 (Figura 2), fue transformado en *E. coli* HB101 que contenía pRK24. Esta cepa fue utilizada como donante en placas con *B. coagulans* DSM 1.

2) Transferencia conjugada de pJS28 de *E. coli* a *B. coagulans*.

Un cultivo, durante una noche, de *E. coli* conteniendo pJS28 y pRK24 cultivados aeróbicamente a 37°C en LB conteniendo ampicilina y cloramfenicol, fue transferido 1/50 a caldo LB reciente con antibióticos y cultivado hasta una turbidez a 600 nm de 0,56. Un cultivo, durante una noche de *B. coagulans* DSM 1 cultivado aeróbicamente a 45°C en caldo BC fue transferido 1/50 a un caldo reciente BC y cultivado hasta una turbidez a 600 nm de 0,52. Iguales volúmenes (2 mL) de *E. coli* y *B. coagulans* fueron recogidos sobre un filtro de 0,45 µm. El filtro que contenía las células fue transferido a placas BC sin antibióticos e incubado durante una noche a 45°C. Las células fueron retiradas del filtro y series de dilución fueron aplicadas en placas BC e incubadas a 55°C aeróbicamente. Después de 1-2 días aparecieron colonias. La presencia de pJS28 fue confirmada por el aislamiento del ADN plásmido y la integridad fue confirmada por digestión con *NcoI* facilitando el modelo de digestión esperado (fragmentos de 1444-bp y 3299-bp). La eficacia de la conjugación fue aproximadamente de $9,3 \cdot 10^{-7}$ por receptor.

EJEMPLO 4. Construcción de un sistema de expresión derivado de *B. coagulans*

1) Construcción de un sistema de expresión de *B. coagulans*

Un fragmento de secuencia de nucleótido *B. coagulans* ATCC 23498 (dado a conocer en el documento US 5171673) con actividad de promotor, fue producido como fragmento sintético de ADN (Figura 3) y clonado como fragmento *Bg/II*-*Bam*HI en pMH3 digerido con las mismas enzimas. El vector de clonado resultante, pJS25 (Figura 3), permite fusión traslacional a este promotor por la utilización de un sitio *NcoI* solapando el codón inicial. Para posibilitar la utilización de este sitio *NcoI*, se construyó el primer plásmido pMH3 a partir del plásmido pNZ124 eliminando el sitio *NcoI* del gen *cat* utilizando un megacebador. Los cebadores con las secuencias 5'-CTATTATTCGGTGGACTTC-3' y 5'-CAGCTGAGATCTTGGAG-3' fueron utilizados para generar el megacebador, que fue utilizado en una segunda reacción PCR en combinación con un cebador que tenía la secuencia 5'-GACGAAAGTCGACGGCAAT-AGTTAC-3'. El producto de PCR resultante comprendía el gen *cat* completo, y fue digerido con *Bg/II*-*Sa/II* para sustituir el gen pNZ124 *cat* que generaba el plásmido pMH3. El plásmido pJS25 (Figura 4) puede ser utilizado en diferentes organismos mesofílicos Gram-positivos, incluyendo *Bacillus subtilis*, *LactoBacillus casei*, *LactoBacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, y *Leuconostoc lactis*, y el organismo Gram-negativo *Escherichia coli* (utilización del gen *Escherichia coli* β-glucuronidasa (*gusA*) como gen indicador ("reporter") para analizar promotores en bacterias de ácido láctico. C. Platteeuw, G. Simons, y W. M. de Vos. 1994. Appl. Environ. Microbiol. 60:587-593).

2) Construcción del sistema de sobre-expresión de *IdhA*

El gen *L. bulgaricus* LMG 6901 *IdhA* que codifica una R-lactato dehidrogenasa y publicado por Bernard y otros, (Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *LactoBacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. 1991. Bernard, N., T. Ferrain, D. Garmyn, P. Hols, and J. Delcour. FEBS Lett. 290:61-64) fue generado por PCR utilizando cebadores con las secuencias 5'-GACAATTCATGACTAAAATTTTGC-3' y 5'-

GGATT-TCTCTAGACTGCAGTTAGCCAACCTTAA-3'. El producto de PCR fue clonado como fragmento como *XbaI* en pUC18 digerido con *XbaI-SmaI* y se confirmó su identidad por análisis de secuencia de nucleótidos. De manera subsiguiente, el gen *ldhA* fue clonado como fragmento *RcaI-XbaI* en pJS25 digerido con *NcoI-XbaI*. El vector de expresión resultante, pJS26 (Figura 5), tenía el gen *ldhA* de *L. bulgaricus* fusionado translacionalmente al promotor *B. coagulans*. De manera subsiguiente, el fragmento completo comprendiendo el promotor *B. coagulans* y el gen *L. delbrueckii ldhA* fue transferido como fragmento *PstI-Bg/II* (por digestión parcial con *Bg/II*) al vector de clonado termofílico pNW33N digerido con *PstI-BamHI*, generando el plásmido pJS27 (Figura 6).

3) Sobreproducción de R lactato dehidrogenasa

El plásmido pJS27 fue transformado en *B. coagulans* DSM 1 por electroporación. Se determinaron las actividades de enzimas específicas de R-lactato dehidrogenasa como disminución de la absorbancia a 340 nm por minuto por mg de proteína a 50°C. La actividad específica de *B. coagulans* DSM 1 que contiene pNW33N era de 0,45 A min⁻¹ mg proteína⁻¹ y el de *B. coagulans* DSM 1 conteniendo pJS27 era de 2,15 A min⁻¹ mg proteína⁻¹ demostrando que la sobreproducción de R lactato dehidrogenasa en las cepas modificadas conteniendo gen *L. delbrueckii* LMG 6901 *ldhA* tenía como resultado una actividad incrementada en 4,8 veces.

EJEMPLO 5. Modificación genética de *B. coagulans* DSM 1 para producción de R lactato

Se cultivó *B. coagulans* DSM 1 conteniendo pJS27 (EJEMPLO 4) en un cultivo por lote, imitando condiciones industriales. Se utilizaron *B. coagulans* DSM 1 conteniendo pNW33N y *B. coagulans* DSM 1 sin plásmidos como cepas de referencia. Después de fermentación, se determinaron las concentraciones de ácidos orgánicos y la pureza óptica del ácido láctico (Tabla 2). El lactato producido por *B. coagulans* DSM 1 y *B. coagulans* DSM 1 conteniendo pNW33N era enantiopuro en forma S, mientras que el lactato producido por *B. coagulans* DSM 1 conteniendo pJS27 se encontraba en una parte significativa en forma R. No se detectaron diferencias en la formación de subproductos. Las concentraciones de ácido 2-hidróxi-butírico, ácido acético, ácido butírico, ácido fórmico, ácido pirúvico, se encontraron por debajo de los límites de detección (<0,02% para el ácido pirúvico; <0,01 % para otros). Las concentraciones de ácido succínico se encontraron por debajo de 0,1 % (v/v). Estos resultados demuestran que la producción de R lactato por *B. coagulans* se puede conseguir por introducción de un gen R lactato dehidrogenasa. La construcción de la cepa *B. coagulans* produciendo solamente R lactato requerirá la disrupción del gen responsable de la actividad de S lactato dehidrogenasa por mutagénesis al azar o dirigida a un sitio.

TABLA 2. Producción de ácido orgánico a partir de 50 g/L de sacarosa (fermentaciones duplicadas)

| | Glucosa (g/L) | ácido láctico (g/L) | Pureza quiral de ácido S láctico y (S/R+S) * 100% | Pureza quiral de ácido R láctico y (R/S+R) * 100% |
|------------------------------------|---------------|---------------------|---|---|
| <i>B. coagulans</i> DSM 1 | < 0.1 | 25/28 | 99.8/99.7 | 0.2/0.3 |
| <i>B. coagulans</i> DSM 1 + pNW33N | < 0.1 | 25/22 | 99.8/99.7 | 0.2/0.3 |
| <i>B. coagulans</i> DSM 1 + pJS27 | < 0.1 | 26/27 | 84.3/83.1 | 15.7/16.9 |

EJEMPLO 6. Sustitución de gen en *B. coagulans* DSM 1 para producción de R lactato en antiopuro

1) Construcción de un plásmido de integración

Una cepa modificada de *B. coagulans* produciendo R lactato, es construida sustituyendo el gen *B. coagulans ldhL*, que codifica para la actividad principal de S lactato dehidrogenasa, por el gen *L. bulgaricus ldhA* que codifica para R lactato dehidrogenasa. La sustitución es conseguida por recombinación homóloga en un proceso de dos etapas, utilizando un vector de clonado condicional, por ejemplo, un termosensible, que es funcional a 45°C pero no a 55°C. Los inventores han utilizado el replicón pSH71 presente en pNZ124 ó pMH3, en el que se descubrió que tenía una naturaleza termosensible en la especie *Bacillus*, moderadamente termofílica, que son facultativamente anaeróbicas y homolácticas. El vector de integración pRK1 (Figura 7) contiene el replicón pNZ124, dos regiones 1-kb flanqueando *ldhL* en el cromosoma de *B. coagulans* DSM 1 y flanqueando ahora el promotor *B. coagulans* ATCC 23498 fusionado al gen *L. bulgaricus ldhA* y al gen *cat* que codifica la resistencia de cloramfenicol. El vector de integración es construido por ligado de los siguientes cassettes: (i) un fragmento de 1,8-kb *Sall-XbaI*, con el lugar *Sall* transformado en romo, conteniendo el replicón pNZ124; (ii) un fragmento de 1,1-kb *XbaI-BamHI* conteniendo la región de más arriba del gen *ldhL* cortado de un fragmento de PCR generado utilizando los cebadores 5'-GCGAGATCTAGAGGCCATCTGGGGGCTTTCT-3' y 5'-CGCGGATC-CATGGATAATCTTCCCTCCCCATCAAAGTA-3' y *B. coagulans* DSM 1 como plantilla; (iii) un fragmento de 1,0-kb *BamHI-PstI* conteniendo el gen *cat* cortado de un fragmento PCR generado utilizando los cebadores 5-CGCGGATCCCCTTCT-TCAACTAACGGG-3' y 5'-GCGCTGCAGTTCGCTACGCTCAAATCC-3' y pMH3 (EJEMPLO

4) como plantilla; (iv) un fragmento de 1,3-kb *PstI-KpnI* conteniendo el gen *L. bulgaricus* LMG 6901 *IdhA* traslacionalmente fusionado al promotor *B. coagulans* ATCC 23498 *amy* cortado de pJS27 (EJEMPLO 5); (v) un fragmento de 1,1-kb *KpnI-BglII*, con el sitio *BglII* transformado en romo conteniendo la región descendente del gen *IdhL* cortado del fragmento de PCR generado utilizando los cebadores 5'-CGCGGGTACCGGCCGGGCTTTATGG-3' y 5'-GCGCAGATCTGTGCGAGTAAACGCGGAAAGCATTG-3' y *B. coagulans* DSM 1 como plantilla.

2) Intercambio del gen *B. coagulans* DSM 1 *IdhL* con el gen *L. bulgaricus* LMG 6901 *IdhA*

El plásmido pRK1 es transformado en *B. coagulans* DSM 1 por electroporación. Los transformantes son obtenidos en placas BC suplementadas con 7 mg/L de cloramfenicol cultivado a 45°C. Después de la confirmación de la transformación por aislamiento del plásmido, se cultiva una colonia única en caldo BC a 45°C a fase mid-log después de que la temperatura es pasada a 55°C y la incubación se continúe durante 1 hora. Una serie de dilución sea aplicada sobre placas BC e incubada durante una noche a 55°C. Las colonias son reunidas y aplicadas en placas BC en una segunda serie de dilución. Después de incubación durante una noche a 55°C, las colonias son sometidas a prueba, en cuanto a integración por análisis PCR, confirmando un único invento de cruzamiento. Se selecciona una colonia para cultivo continuado por transferencia secuencial de 1/1000 diluciones (aproximadamente 10 generaciones) en caldo BC con antibióticos a 55°C. Después de, aproximadamente, 100 generaciones, se aplica una serie de dilución en placas BC con antibióticos. Después de incubación durante una noche a 55°C, se comprueban series de colonias en cuanto a la ausencia del gen *IdhL* por medio de PCR de colonias. De manera alternativa, se puede rastrear un mutante de cruzamiento doble entre los mutantes de cruzamiento simple del primer evento, comprobando la ausencia del gen *IdhL* por PCR de colonias. Se aísla ADN cromosómico de una colonia negativa en estas reacciones PCR, y se evalúa posteriormente en cuanto a la presencia de *IdhA*, y la correcta integración es confirmada por análisis Southern blot.

25 EJEMPLO 7. Producción de R lactato enantiopuro con *B. coagulans* DSM 1 modificado

1) Construcción de cepa modificada

Con el método descrito en el ejemplo 6, se construyó un derivado de *B. coagulans* DSM 1 con el gen *IdhL* sustituido por un cassette que contenía el gen *IdhA* de una cepa industrial *L. delbrueckii* fusionada al promotor *IdhL* de una cepa industrial *B. coagulans* y el gen cat pMH3. La cepa resultante, fue designada RDSM 1.

2) Fermentación con RDSM 1

La cepa RDSM 1 fue cultivada en un cultivo de lote imitando las condiciones industriales. Después de la fermentación, las concentraciones de ácidos orgánicos y pureza óptica del ácido láctico, fueron determinadas (Tabla 3). El lactato producido por *B. coagulans* RDSM 1 era de 99,5% de forma R. No se detectaron diferencias en la formación de subproductos en comparación con *B. coagulans* DSM 1 (Ejemplo 5). Las concentraciones de ácido 2 hidroxibutírico, ácido acético, ácido butírico, ácido fórmico, ácido pirúvico, se encontraban por debajo de los límites de detección (<0,02% para el ácido pirúvico; <0,01 % para otros). Las concentraciones de ácido succínico, se encontraban por debajo de 0,1% (v/v). Estos resultados demuestran delección cromosómica de genes *B. coagulans* nativos y la inserción cromosómica y expresión funcional de genes (heterólogos) es posible y puede ser aplicada para la producción de R lactato enantiopuro por *B. coagulans*.

TABLA 3. Producción de ácido orgánico a partir de 50 g/L de sacarosa (fermentaciones duplicadas)

| | Glucosa (g/L) | ácido d (g/L) | Pureza quiral de ácido S láctico y (S/R+S) * 100% | Pureza quiral de ácido R láctico y (R/S+R) * 100% |
|----------------------------|---------------|---------------|---|---|
| <i>B. coagulans</i> DSM 1 | < 0.1 | 25/28 | 99.8/99.7 | 0.2/0.3 |
| <i>B. coagulans</i> RDSM 1 | < 0.1 | 27/28 | 0.5/0.5 | 99.5/99.5 |

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Purac Biochem BV

<120> Modificación genética de Bacilos termofílicos homolácticos

5 <130> W09639-He/vw

<160> 16

10 <170> Versión PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 232

<212> PRT

15 <213> Plásmido pSH71

<400> 1

Met Ala Ile Lys Asn Thr Lys Ala Arg Asn Phe Gly Phe Leu Leu Tyr
1 5 10 15

Pro Asp Ser Ile Pro Asn Asp Trp Lys Glu Lys Leu Glu Ser Leu Gly
20 25 30

Val Ser Met Ala Val Ser Pro Leu His Asp Met Asp Glu Lys Lys Asp
35 40 45

Lys Asp Thr Trp Asn Ser Ser Asp Val Ile Arg Asn Gly Lys His Tyr
50 55 60

Lys Lys Pro His Tyr His Val Ile Tyr Ile Ala Arg Asn Pro Val Thr
65 70 75 80

Ile Glu Ser Val Arg Asn Lys Ile Lys Arg Lys Leu Gly Asn Ser Ser
85 90 95

Val Ala His Val Glu Ile Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Ser Tyr Glu Tyr
100 105 110

Leu Thr His Glu Ser Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Lys His Ile Tyr
115 120 125

Asp Lys Lys Asp Ile Leu Asn Ile Asn Asp Phe Asp Ile Asp Arg Tyr
130 135 140

Ile Thr Leu Asp Glu Ser Gln Lys Arg Glu Leu Lys Asn Leu Leu Leu
145 150 155 160

Asp Ile Val Asp Asp Tyr Asn Leu Val Asn Thr Lys Asp Leu Met Ala
165 170 175

Phe Ile Arg Leu Arg Gly Ala Glu Phe Gly Ile Leu Asn Thr Asn Asp
180 185 190

Val Lys Asp Ile Val Ser Thr Asn Ser Ser Ala Phe Arg Leu Trp Phe
195 200 205

Glu Gly Asn Tyr Gln Cys Gly Tyr Arg Ala Ser Tyr Ala Lys Val Leu
210 215 220

Asp Ala Glu Thr Gly Glu Ile Lys
225 230

ES 2 371 828 T3

<210> 2
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

5

<400> 2

```

Met Thr Lys Ile Phe Ala Tyr Ala Ile Arg Glu Asp Glu Lys Pro Phe
 1           5           10           15

Leu Lys Glu Trp Glu Asp Ala His Lys Asp Val Glu Val Glu Tyr Thr
      20           25           30

Asp Lys Leu Leu Thr Pro Glu Thr Val Ala Leu Ala Lys Gly Ala Asp
      35           40           45

Gly Val Val Val Tyr Gln Gln Leu Asp Tyr Thr Ala Glu Thr Leu Gln
      50           55           60

Ala Leu Ala Asp Asn Gly Ile Thr Lys Met Ser Leu Arg Asn Val Gly
 65           70           75           80

Val Asp Asn Ile Asp Met Ala Lys Ala Lys Glu Leu Gly Phe Gln Ile
      85           90           95

Thr Asn Val Pro Val Tyr Ser Pro Asn Ala Ile Ala Glu His Ala Ala
      100           105           110

Ile Gln Ala Ala Ala Ile Leu Arg Gln Asp Lys Ala Met Asp Glu Lys
      115           120           125

Val Ala Arg His Asp Leu Arg Trp Ala Pro Thr Ile Gly Arg Glu Val
      130           135           140
    
```

ES 2 371 828 T3

Arg Asp Gln Val Val Gly Val Ile Gly Thr Gly His Ile Gly Gln Val
145 150 155 160

Phe Met Gln Ile Met Glu Gly Phe Gly Ala Lys Val Ile Thr Tyr Asp
165 170 175

Ile Phe Arg Asn Pro Glu Leu Glu Lys Lys Gly Tyr Tyr Val Asp Ser
180 185 190

Leu Asp Asp Leu Tyr Lys Gln Ala Asp Val Ile Ser Leu His Val Pro
195 200 205

Asp Val Pro Ala Asn Val His Met Ile Asn Asp Glu Ser Ile Ala Lys
210 215 220

Met Lys Gln Asp Val Val Ile Val Asn Val Ser Arg Gly Pro Leu Val
225 230 235 240

Asp Thr Asp Ala Val Ile Arg Gly Leu Asp Ser Gly Lys Ile Phe Gly
245 250 255

Tyr Ala Met Asp Val Tyr Glu Gly Glu Val Gly Ile Phe Asn Glu Asp
260 265 270

Trp Glu Gly Lys Glu Phe Pro Asp Ala Arg Leu Ala Asp Leu Ile Ala
275 280 285

Arg Pro Asn Val Leu Val Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Thr His
290 295 300

Ala Val Arg Asn Met Val Val Lys Ala Phe Asp Asn Asn Leu Glu Leu
305 310 315 320

Val Glu Gly Lys Glu Ala Glu Thr Pro Val Lys Val Gly
325 330

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

10 <400> 3

tcgccttctt ctgtgtcatc 20

<210> 4

ES 2 371 828 T3

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 4
ctggaggaga gcaatgaaac 20

10 <210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 5
20 ctattattcc gtggacttc 19

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
25 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

30 <400> 6
cagctgagat ctggag 17

<210> 7
<211> 25
35 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

40 <400> 7
gacgaaagtc gacggcaata gttac 25

<210> 8
45 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
50 <223> cebador

<400> 8
gacaattcat gactaaaatt tttgc 25

55 <210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

60 <220>
<223> cebador

<400> 9
65 ggatttctct agactgcagt tagccaacct taa 33

ES 2 371 828 T3

<210> 10
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial
5
<220>
<223> cebador

<400> 10
10 gcgagatcta gaggccatct ggggggcttt ct 32

<210> 11
<211> 38
<212> DNA
15 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 11
20 gcg gatcca tggataatct tctcccat caaaagta 38

<210> 12
<211> 27
25 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

30 <400> 12
gcg gatccc ttcttcaac taacggg 27

<210> 13
<211> 27
35 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
40 <223> cebador

<400> 13
gcgctgcagt tcgctacgct caaatcc 27

45 <210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

50 <220>
<223> cebador

<400> 14
55 gcg ggtacc ggccgggctt tatgg 25

<210> 15
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial
60

<220>
<223> cebador

<400> 15
65 gcgcagatct gtcagtaaa cgcgaaagc attg 34

<210> 16
<211> 304
<212> DNA
5 <213> Artificial
<220>

<223> región promotora

10 <400> 16

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la modificación de especies de *Bacillus* moderadamente termofílicos que son facultativamente anaeróbicos y homolácticos por ingeniería genética, comprendiendo:
- 5 introducir un ADN clonado en un sistema de plásmido termosensible, conteniendo un replicón pSH71 o un homólogo del mismo, cuyo homólogo comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido que tiene una funcionalidad de replicación termosensible (proteína RepA) que tiene una secuencia de aminoácido que es, como mínimo, 80% idéntica a la SEQ ID NO:1, en células de una especie *Bacillus* moderadamente termofílica, que es facultativamente anaeróbica y homoláctica;
- 10 cultivar las células en un medio selectivo a una temperatura permisiva para replicación de plásmido para seleccionar células transformadas capaces de crecimiento en dicho medio selectivo a dicha temperatura permisiva;
- 15 cultivar dichas células transformadas en un medio selectivo a una temperatura no permisiva para la replicación de plásmido
- 20 seleccionar células transformadas capaces de crecimiento en dicho medio selectivo a dicha temperatura no permisiva.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la especie *Bacillus* son *Bacillus smithii* y/o *Bacillus coagulans*.
- 25 3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la especie *Bacillus* es deficiente en cuanto a esporulación.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la especie *Bacillus* es un derivado moderadamente termofílico y facultativamente anaeróbico de una especie parental de *Bacillus* moderadamente termofílica, que es facultativamente anaeróbica y homoláctica.
- 30 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ADN proporciona una funcionalidad deseada.
- 35 6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cultivo a la temperatura no permisiva para replicación de plásmido, permite la introducción del ADN en el cromosoma de *Bacillus*, preferentemente, por recombinación homóloga.
- 40 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la funcionalidad no deseada es eliminada del cromosoma de *Bacillus*, por recombinación homóloga.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se introduce una funcionalidad deseada en el cromosoma de *Bacillus* y, simultáneamente, se elimina una funcionalidad no deseada del cromosoma de *Bacillus*, por recombinación homóloga.
- 45 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que la especie *Bacillus* es modificada sustituyendo el gen que codifica S lactato dehidrogenasa por un constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácido, de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácido, sustancialmente homóloga de la misma, que tiene actividad de R lactato dehidrogenasa fusionada a un promotor funcional en una especie *Bacillus*.
- 50 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que el promotor es del endógeno S lactato dehidrogenasa es eliminado.
- 55 11. Cepa de *Bacillus*, moderadamente termofílica de ingeniería genética, que es facultativamente anaeróbica y homoláctica, en la que el gen *IDIL* que codifica para S lactato dehidrogenasa, es sustituido por un gen que codifica para 2 hidroxí-ácido dehidrogenasa, dependiente de NADH que tiene actividad de R lactato dehidrogenasa, en el que dicha cepa de *Bacillus* se puede obtener por un método, según la reivindicación 9 ó 10.
- 60 12. Procedimiento para la preparación de ácido R láctico y/o R lactato, en el que se utiliza la especie *Bacillus* moderadamente termofílica genéticamente modificada, que es facultativamente anaeróbica, de la reivindicación 11.



Figura 1

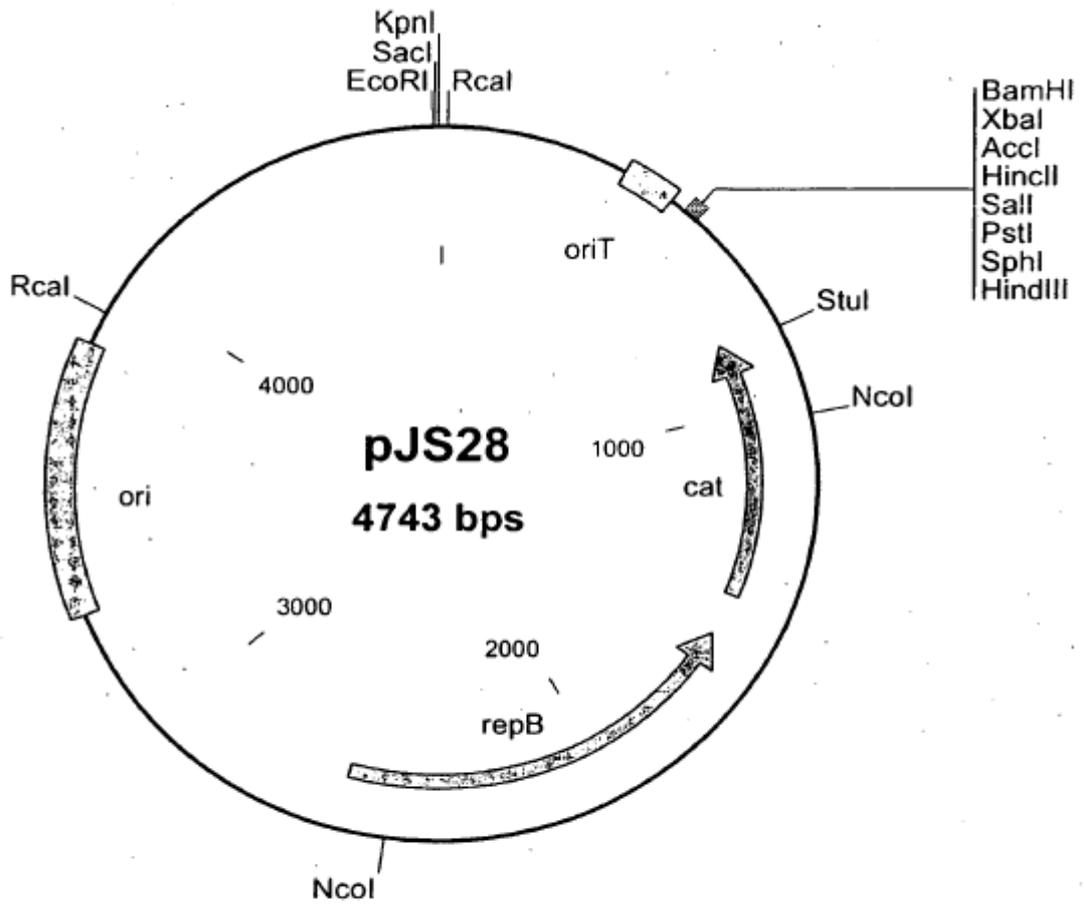


Figura 2

1 AGATCTTGGT TCCCCACCTT TTTTACAGAC TTATCACTAT ATTATTATAG
51 ATAAACCGGC CAAACAACCA AATCGGGGCG CAAAGGAGAG CCGGGGCGTG
101 GATTTAAACC ATTTTTGGAA AAACAAAAGG AAAACCTGCT TGTA AAAAGA
151 TGTTTTCGCG AAACGAAAGC GGAATAGTA CCTTTGTTCT CTTCGCCTTT
201 TGTCATGCTT AAAATCATAA TTGATTGAAA ATTTTTTCAT GTTCACTTAT
251 ACTAAACGCA TCAACTATTA CTTCTTTTGG AAGGGGCAGT TTCCATGGGG
301 ATCC

Figura 3

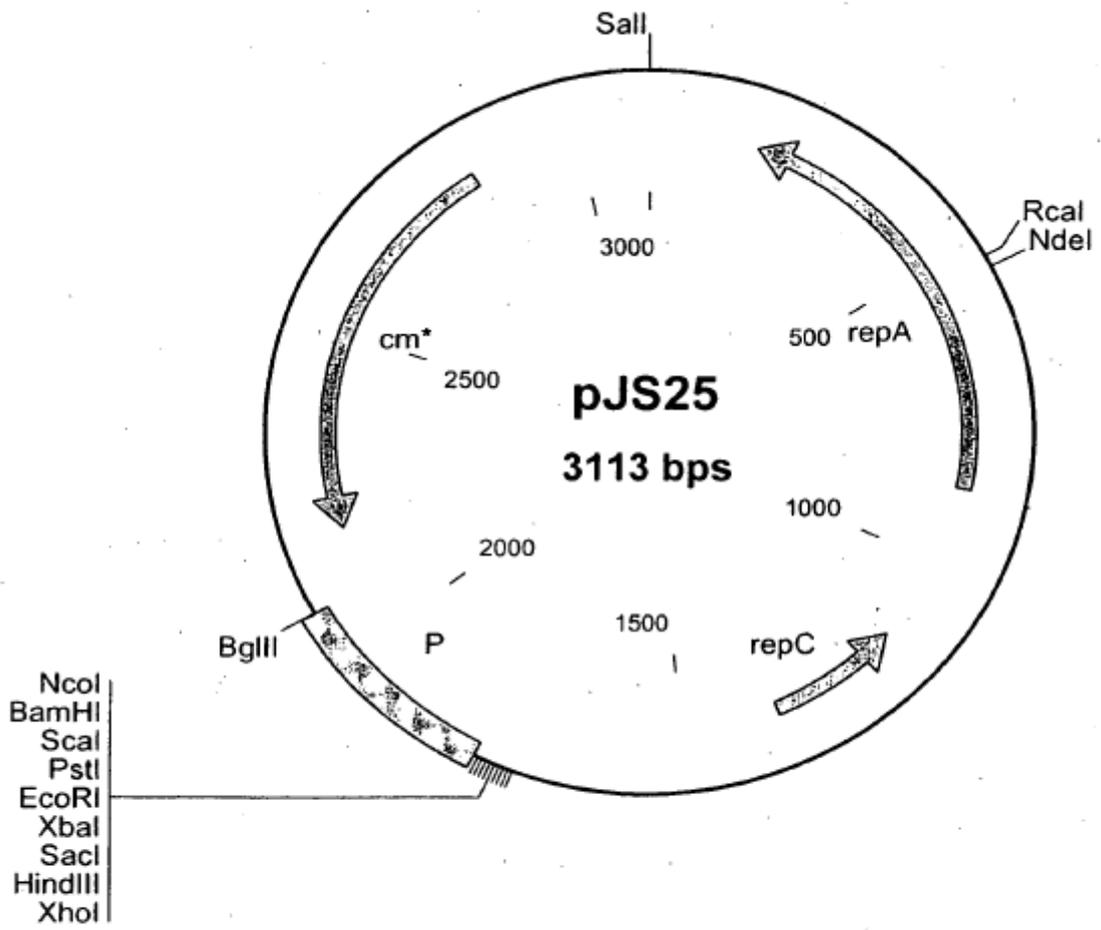


Figura 4

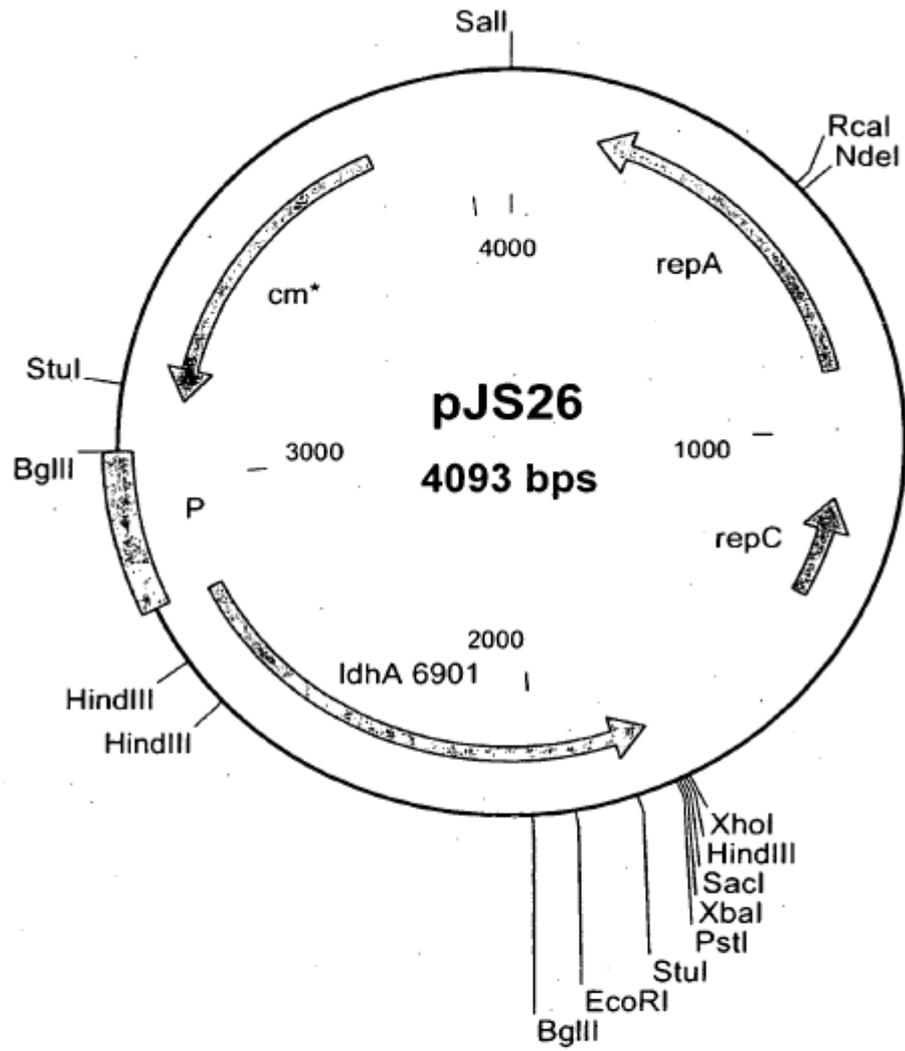


Figura 5

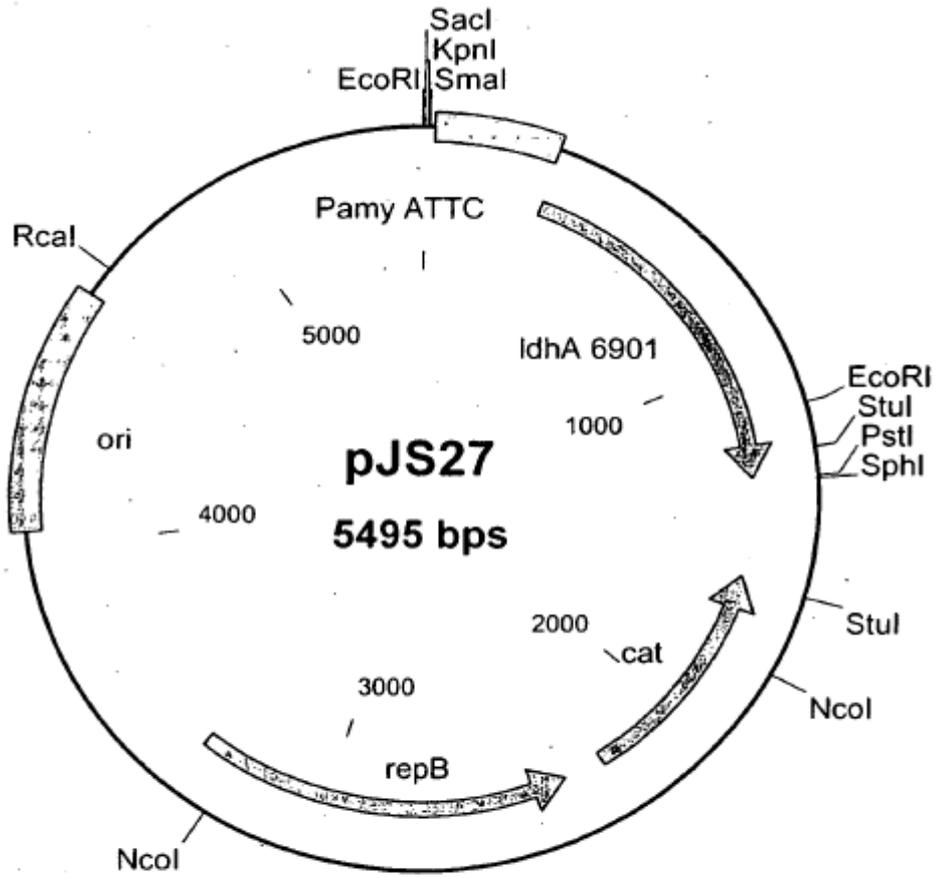


Figura 6

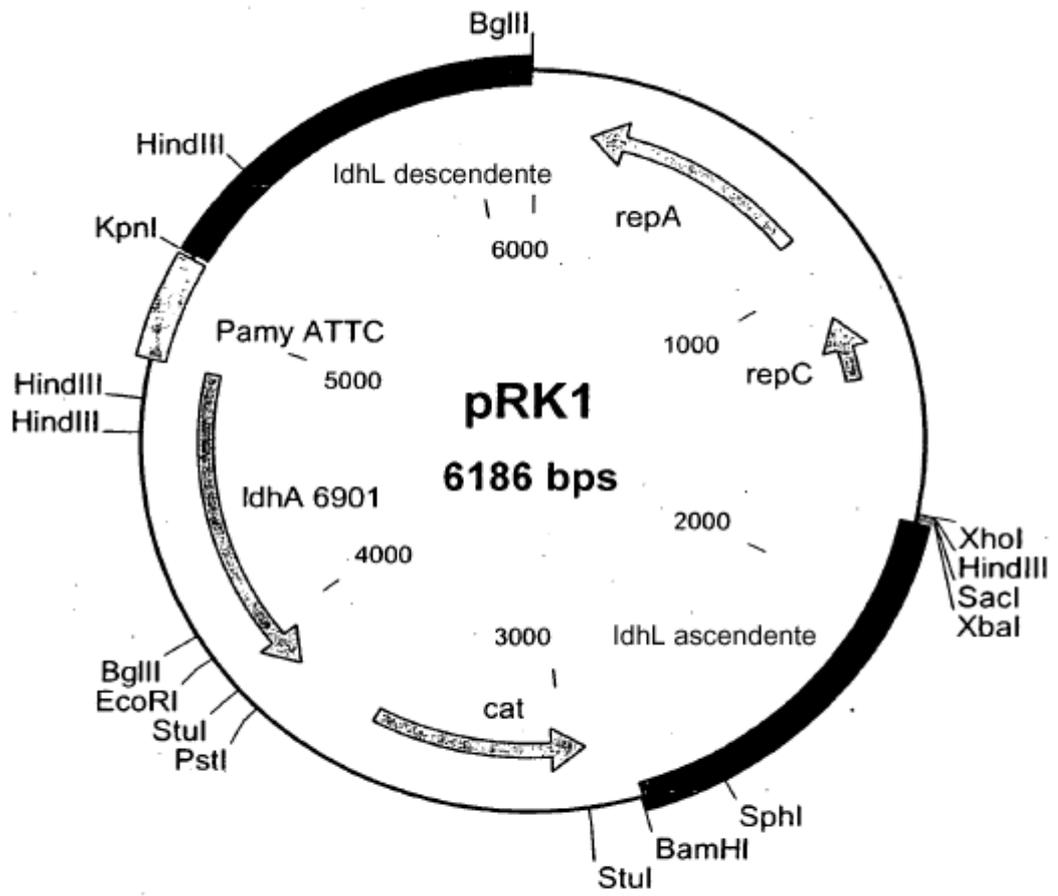


Figura 7